

(9)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(10)

Veröffentlichungsnummer:

0 299 402
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88111031.6

(51) Int. Cl. 4: C07K 7/20 , A61K 37/02

(22) Anmeldetag: 11.07.88

(30) Priorität: 17.07.87 US 74126

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
18.01.89 Patentblatt 89/03(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE(71) Anmelder: ASTA Pharma Aktiengesellschaft
Weismüllerstrasse 45
D-6000 Frankfurt am Main 1(DE)(72) Erfinder: Schally, Andrew V., Prof.
5025 Kawanee Avenue
Metairie, LA 70002(US)
Erfinder: Bajusz, Sandor, Dr.
10501 Curran Boulevard no. 5W
New Orleans, LA 70127(US)

(54) LHRH Antagonisten, deren Herstellung und entsprechende pharmazeutische Zubereitungen.

(57) LHRH-Antagonisten sind beschrieben, die eine verbesserte Wasserlöslichkeit aufweisen, und die während sie eine hohe antagonistische Wirksamkeit der basischen Peptide aufweisen, frei von oedematösen Auswirkungen sind. Diese Verbindungen sind hochwirksam in der Hemmung der Freisetzung von Gonadotropinen aus der Hirnanhangsdrüse von Säugetieren einschliesslich Menschen.

Die Verbindungen werden durch die folgende Formel wiedergegeben:



worin

X eine Acylgruppe aus geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamoyl-Gruppe ist,

R¹ D- oder L-Pro, D- oder L-³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-Cl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R² D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist,

R³ D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R⁶ D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) und

R¹⁰ Gly oder D-Ala ist,

wobei HI Fluor, Chlor oder Brom und Q C₁-C₃-Alkyl ist,

und die pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze davon und Verfahren zur Verwendung in bezug auf diese Verbindungen.

EP 0 299 402 A2

LHRH ANTAGONISTEN, deren Herstellung und entsprechende pharmazeutische Zubereitungen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Peptide, die die Freisetzung von Gonadotropinen durch die Hirnanhangsdrüse bei Säugetieren hemmen, ohne jedoch oedematöse Reaktionen hervorzurufen. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Analoge des das luteinisierende Hormon freisetzende Hormons (LHRH), das die folgende Struktur aufweist:

p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂,

Salze davon und pharmazeutische Verbindungen und Anwendungsverfahren, die diese Analoge betreffen.

Während mehr als 15 Jahren haben Forscher nach selektiv potenten Antagonisten des LHRH-Dekapeptids [M. Karten und J.E. Rivier, *Endocrine Reviews*, **7**, 44-66 (1986)] gesucht. Das hohe Interesse an solchen Antagonisten ist in ihrer Nützlichkeit im Bereich der Endokrinologie, Gynäkologie, Schwangerschaftsverhütung und Krebs begründet. Eine grosse Anzahl von Verbindungen sind als potentielle LHRH-Antagonisten hergestellt worden. Die interessantesten Antagonisten, die bis heute gefunden worden sind, sind jene Verbindungen, deren Struktur eine Modifizierung der LHRH-Struktur darstellen.

Die erste Serie von potenten Antagonisten wurde durch die Einführung von aromatischen Aminosäureresten in den Stellungen 1, 2, 3 und 6 oder 2, 3 und 6 erhalten. Die Verbindungen werden beschrieben als LHRH, das durch das Ersetzen der ursprünglichen Aminosäurereste durch andere an den durch die

hochgestellten Nummern bezeichnet wird. Die bekannten Antagonisten umfassen:

[Ac-D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp^{3,6}] LHRH (D.H. Coy, et al., In: Gross, E. and Meienhofer, J. (Eds) *Peptides*, Proceedings of the 6th American Peptid Symposium, S. 775-779, Pierce Chem.Co., Rockville, Ill., 1979);

[Ac-Pro¹, D-Phe(4-Cl)², D-Nal(2)^{3,6}] LHRH (US Patent Nr. 4,419,347) und

[Ac-³Pro¹, D-Phe(4-Cl)², D-Trp^{3,6}] LHRH (J.L. Pineda, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **56**, 420, 1983).

Um die Wasserlöslichkeit der Antagonisten zu erhöhen, wurden später basische Aminosäuren, wie zum Beispiel D-Arg, in der 6-Stellung eingeführt. Zum Beispiel [Ac-D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰] LHRH (ORG-30276) (D.H. Coy, et al., *Endocrinology*, **100**, 1445, 1982); und

[Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶] LHRH (ORF 18260) (J.E. Rivier, et al., In: Vickery B.H., Nestor, Jr. J.J., Hafez, E.S.E. (Eds), *LHRH and Its Analogs*, S. 11-22 MTP Press, Lancaster, UK, 1984).

Die Analoge wiesen nicht nur die erwartete verbesserte Wasserlöslichkeit auf, sondern zeigten auch eine verbesserte antagonistische Wirksamkeit. Dennoch verursachen diese äusserst potenten, hydrophilen Analoge mit D-Arg und anderen basischen Seitenketten an der 6. Stellung, vorübergehende Oedeme auf dem Gesicht und den Extremitäten zu bilden, wenn sie Ratten in Dosen von 1,25 oder 1,5 mg/kg subkutan verabreicht wurden (F. Schmidt, et al., *Contraception*, **29**, 283, 1984; J.E. Morgan, et al., *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* **80**, 70, (1986)). Da das Auftreten von oedematogenen Auswirkungen nach der Verabreichung dieser Antagonisten bei Ratten Zweifel über ihre Sicherheit bei der Verwendung bei Menschen aufkommen liessen und so die Einführung dieser Arzneimittel in die klinische Verwendung verzögerten, ist es wünschenswert, antagonistische Peptide vorzusehen, die frei von diesen Nebenwirkungen sind.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf LHRH-Antagonisten, die eine verbesserte Wasserlöslichkeit und hohe antagonistische Potenz der basischen Peptide aufweisen und frei von oedematogenen Wirkungen sind. Diese Verbindungen sind hochpotent bei der Hemmung der Freisetzung von Gonadotropinen aus der Hirnanhangsdrüse bei Säugetieren, einschliesslich bei Menschen.

Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung werden durch Formel I dargestellt:



worin

X eine Acylgruppe, von geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen, oder eine Carbamoylgruppe ist,

R¹ D- oder L-Pro, D- oder L-Δ³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-HI), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R² D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist,

R³ D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

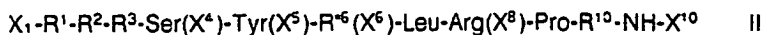
R⁶ D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q)

R¹⁰ Gly oder D-Ala ist,

wobei HI Fluor, Chlor oder Brom und Q C₁-C₃-Alkyl ist, und pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze davon.

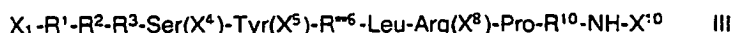
Die Verbindungen der Formel I werden nach den bekannten Methoden synthetisiert, wie zum Beispiel durch reine Festphasentechnik, teilweise Festphasentechnik oder durch die klassischen Lösungskupplungen. Die Verbindungen der Formel I werden vorzugsweise durch eine bekannte Festphasentechnik herge-

stellt. Eine derartige Methode liefert Zwischenpeptide beziehungsweise Zwischenpeptidharze der Formel II:



- 5 worin X_1 eine Acylgruppe ist, basierend auf geraden und verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen (insbesondere Acetyl), t-Boc, Wasserstoff oder Carbamoyl, X^4 eine Schutzgruppe für die Ser-Hydroxygruppe ist (zum Beispiel Benzyl, 2,6-Dichlor-benzyl), X^5 eine Schutzgruppe für die Tyr-phenolische Hydroxylgruppe ist (zum Beispiel Benzyl, 2,6-Dichlor-benzyl, 2-Chlor(2-brom)-benzyloxycarbonyl; Benzyloxycarbonyl),
 10 X^6 eine Schutzgruppe für die Lys- oder Orn Seitenkette-Aminogruppe ist (Benzyloxycarbonyl), 2-Chlorbenzyloxycarbonyl),
 X^8 eine Schutzgruppe für die Arg-Guanidinogruppe ist (NO_2 , Tos),
 X^{10} ein Benzhydryl- oder Methylbenzhydrylgruppen erhaltendes Trägerharz ist,
 R^1 D- oder L-Pro, D- oder L- Δ^3 -Pro, D-Phe, D-Phe(4-HI), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,
 15 R^2 D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist,
 R^3 D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1), oder D-Nal(2) ist,
 R^6 D-Lys oder D-Orn, D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) und R^{10} Gly oder D-Ala ist,
 wobei HI Fluor, Chlor oder Brom ist,

- Eine Verfahrensweise besteht beispielsweise in der Umsetzung eines Peptides der Formel II, worin R^6
 20 D-Lys oder D-Orn und X^6 Wasserstoff sind, mit einem Cyanat oder einer Verbindung die Cyanat liefert (Cyanat-Quelle) zu einem Peptid der Formel III:



- 25 worin X_1 , R^1 , R^2 , R^3 , X^4 , X^5 , X^8 , R^{10} und X^{10} die angegebenen Bedeutungen haben und R^{10} Cit, Hci, Cit(Q) oder Hci(Q) ist. Vorzugsweise wird diese Reaktion ausgeführt, wenn X_1 Acyl ist und alle anderen Reste X Wasserstoff sind.

- Geeignete Cyanate beziehungsweise cyanatliefernde Verbindungen sind: Alkalicyanate (zum Beispiel Kaliumcyanat), N-niederalkyl-isocyanate (N-ethylisocyanat). Die Peptide der Formel II werden vorzugsweise
 30 nach der bekannten Festphasentechnik synthetisiert. Die Umsetzung mit Cyanaten beziehungsweise cyanatliefernde Verbindungen wird in Lösungsmitteln, vorzugsweise aprotischen Mitteln wie zum Beispiel wässrigen DMF bei Temperaturen zwischen 0 und 50 °C, vorzugsweise 0 und 25 °C durchgeführt.

- Der Fortgang dieser Reaktion, das heißt die Überführung von Orn/Lys-Peptiden in die entsprechenden Cit/Hci-Peptide kann leicht verfolgt werden durch HPLC in MeCN-wässrigen TFA-Systemen, infolge eines
 35 charakteristischen $2,6 \pm 0,3$ Minuten-Anstiegs der Retentionszeit von Cit/Hci- und zum Beispiel Cit(Ethyl)-Hci(Ethyl)-Peptiden im Vergleich zu den entsprechenden Orn/Lys-Peptiden.

- Peptide der Formel I worin X eine Acylgruppe ist, werden direkt durch Spaltung und Entschützen der Zwischenpeptidharze der Formel II erhalten, worin X_1 eine Acylgruppe und R^6 D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q), Peptide der Formel I, worin X eine Carbamoyl-Gruppe ist, werden aus Peptidharzen der Formel II
 40 erhalten, worin X_1 Wasserstoff oder Boc ist, und zwar durch Spaltung und Entschützen mit anschließender Carbamoylierung.

Eine Gonadotropin antagonisierende, pharmazeutische Zusammensetzung wird durch Mischen der Verbindung der Formel I mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger einschliesslich Mikrokügelchen für die verzögerte Abgabe vorgesehen.

- 45 Es ist ebenfalls ein Verfahren vorgesehen, durch das Komplikationen erleichtert werden, die sich aus der physiologischen Verfügbarkeit von Mengen von Gonadotropinen aus der Hirnanhangsdrüse beim Säugetier ergeben, die über der gewünschten Menge liegen, was die Verabreichung an ein Säugetier einer Gonadotropin antagonisierenden Dosis der Verbindung der Formel I umfasst.

- Die zur Definierung der Peptide verwendete Nomenklatur stimmt mit jener durch die IUPAC-IUB-
 50 Kommission über Biochemische Nomenklatur erläuterten Nomenklatur überein (European J. Biochem., 1984, 138, 9-37), worin in Übereinstimmung mit der herkömmlichen Darstellung die Aminogruppen beim N-Terminus nach-links erscheinen und die Carboxylgruppe beim C-Terminus nach rechts. Der Ausdruck natürliche Aminosäuren wird allgemein für natürlich auftretende Aminosäuren verwendet, die in Proteinen gefunden werden, die Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro
 55 Trp und His umfassen. Die Abkürzungen für die einzelnen Aminosäurereste beruhen auf dem Trivialname der Aminosäure und sind Ala, Alanin; Arg, Arginin; Cit, Citrullin; Gly, Glycin; Hci, Homocitrullin; Leu, Leucin; Lys, Lysin; Pal(3), 3-(3-Pyridyl)alanin; Nal(2), 3-(2-Naphtyl)alanin; Nal(1), 3-(1-naphtyl)alanin; Orn, Ornithin; Phe, Phenylalanin; Phe(4-Cl), 4-Chlorphenylalanin; Phe(4-F), 4-Fluorphenylalanin; Pro, Prolin; Ser, Serin;

Trp. Tryptophan und Tyr. Tyrosin. Alle hier beschriebenen Aminosäuren stammen aus der L-Serie, wenn nicht anders erwähnt, zum Beispiel D-Trp bedeutet D-Tryptophan und D-Nal(2) bedeutet 3-(2-Naphtyl)-D-Alanin. D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) bedeutet, daß ein H-Atom der Aminogruppe des Ureidoteils des Citrullins (Homocitrullins) durch die Alkylgruppe Q substituiert ist. Andere verwendete Abkürzungen sind:

- 5 AcOH Essigsäure
- AcOEt Aethylacetat
- Ac₂O Essigsäureanhydrid
- Boc- tert. Butyloxycarbonyl-
- DIC Diisopropylcarbodiimid
- 10 DIEA N,N-Diisopropyläthylamin
- DMF Dimethylformamid
- HOBt 1-Hydroxybenzotriazolhydrat
- HPLC Hochdruckflüssigchromatographie
- MeOH Methylalkohol
- 15 TEA Triäthylamin
- DCC Dicyclohexylcarbodiimid
- MeCN Acetonitril
- IpOH Isopropanol
- Z(2-Cl) 2-Chlorbenzyloxycarbonyl
- 20 DCB 2,6-Dichlorbenzyl
- Tos p-Toluolsulfonyl
- TFA Trifluoressigsäure
- Z Benzyloxycarbonyl

Besonders bevorzugt sind die LHRH-Analoga der Formel I, worin:

- 25 X Acetyl oder Carbamoyl ist,
- R¹ D-Phe(4-Cl), D-Nal(2), Pro oder D-Phe ist,
- R² D-Phe(4-Cl) oder D-Phe(4-F) ist,
- R³ D-Trp oder D-Pal(3) ist,
- R⁶ D-Cit, D-Hci, D-Cit(Ethyl), D-Hci(Ethyl) ist und
- 30 R¹⁰ D-Ala ist.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide erfolgt dadurch, daß man sie durch in der Peptidchemie übliche Fragmentkondensation von entsprechenden Peptidbruchstücken oder durch in der Peptidchemie üblichen stufenweisen Aufbau herstellt oder daß man in einem Peptid der Formel I, worin R⁶ D-Orn oder D-Lys ist, die freie Aminogruppe von D-Orn oder D-Lys durch Umsetzung mit einem Alkalicyanat oder einer Cyanatliefernden Verbindung oder einem C₁-C₃-Alkylisocyanat zur Ureidogruppe umsetzt und gegebenenfalls die erhaltenen Peptide acyliert und/oder in die Amide überführt und gegebenenfalls in physiologisch unbedenkliche Säuresalze überführt.

Der stufenweise Aufbau erfolgt zum Beispiel, indem man zunächst die Carboxy-terminale Aminosäure Glycin oder D-Alanin beziehungsweise deren Amide, deren α-ständige Aminogruppe geschützt ist, an einen hierfür üblichen synthetischen Träger kovalent bindet, die α-Amino-Schutzgruppe abspaltet, an die so erhaltene freie Aminogruppe die nächstfolgende geschützte Aminosäure über ihre Carboxy-Gruppe bindet, dann wiederum die α-Amino-Schutzgruppe dieser zweiten Aminosäure abspaltet, hieran die nächste Aminosäure bindet und in dieser Weise Schritt für Schritt die übrigen Aminosäuren des zu synthetisierenden Peptids in der richtigen Reihenfolge verknüpft und nach Verknüpfung aller Aminosäuren das fertige Peptid gemäß Anspruch 1 vom Träger abspaltet und gegebenenfalls weitere vorhandene Seitenfunktions-Schutzgruppen abspaltet.

Bei der Fragmentkupplung verwendet man vorzugsweise die ohne Racemisierung verlaufende Azidkupplung oder die Dicyclohexylcarbodiimid-1-Hydroxybenzotriazolbeziehungsweise DCC-3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin-Methode. Man kann auch aktivierte Ester von Fragmenten einsetzen (DCC = Dicyclohexylcarbodiimid).

Für die stufenweise Kondensation von Aminosäuren eignen sich besonders gut aktivierte Ester von Benzyloxycarbonyl-aminosäuren, wie zum Beispiel N-Hydroxysuccinimidester oder 2,4,5-Trichlorphenylester und 4-Nitrophenylester. Die Aminolyse der beiden letzteren Aktivester läßt sich sehr gut durch N-Hydroxyverbindungen, die in etwa die Acidität der Essigsäure besitzen, wie zum Beispiel 1-Hydroxybenzotriazol katalysieren.

Als intermediäre Aminoschutzgruppen bieten sich abhydrierbare Gruppen wie zum Beispiel der Benzyloxycarbonylrest (= Z-Rest) oder schwach sauer abspaltbare Gruppen wie zum Beispiel der 2-(p-Diphenyl)-isopropoxyloxycarbonyl- oder 2-(3,5-Dimethoxyphenyl)-isopropoxy-carbonylrest an.

Die stufenweise Kondensation erfolgt durch Synthese aus den entsprechenden, gegebenenfalls in üblicher Weise geschützten Aminosäuren, in herkömmlicher Weise. Ebenfalls ist die Verwendung automatischer Peptid-Synthesierer, zum Beispiel Beckman Model 990 Peptid Synthetisierer möglich unter Verwendung der auf übliche Weise im Handel erhältlichen geschützten Aminosäuren.

5 Diese Synthese erfolgt zum Beispiel in der hierfür üblichen Weise aus den entsprechenden geschützten Aminosäuren, indem man zunächst die Carboxy-terminale Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids, deren α -ständige Aminogruppe geschützt ist, an einen hierfür üblichen synthetischen Träger kovalent bindet, die α -Amino-Schutzgruppe abspaltet, an die so erhaltene freie Aminogruppe die nächstfolgende geschützte Aminosäure über ihre Carboxy-Gruppe bindet, dann wiederum die α -Amino-Schutzgruppe dieser zweiten Aminosäure abspaltet, hieran die nächste Aminosäure bindet und in dieser Weise
10 Schritt für Schritt die übrigen Aminosäuren des zu synthetisierenden Peptids in der richtigen Reihenfolge verknüpft und nach Verknüpfung aller Aminosäuren das fertige Peptid vom Träger abspaltet und gegebenenfalls weitere vorhandene Seitenfunktions-Schutzgruppen abspaltet.

Die Reaktion zur Verknüpfung der Aminosäuren finden in dem Temperaturbereich von 10 - 40° C.
15 vorzugsweise 20 - 30° C. gegebenenfalls in einem hierfür üblichen indifferenten Lösungs- oder Suspensionsmittel (zum Beispiel Dichlormethan) statt, wobei gegebenenfalls zur Verbesserung der Löslichkeit bis zu 20% Dimethylformamid zugesetzt werden kann.

Als synthetisches Trägermaterial kommen synthetische Polymere in Frage, zum Beispiel quellbares Polystyrolharz in Perlenform (beispielsweise ein chlormethyliertes Copolymerisat aus Polystyrol und 1%
20 Divinylbenzol). Als Schutzgruppen für die α -ständigen Aminogruppen kommen zum Beispiel in Frage: tertiäre Butyloxycarbonylgruppe, Carbobenzyoxygruppe beziehungsweise Carbobenzthiogruppe (gegebenenfalls jeweils mit p-Brom oder p-Nitro-benzylrest), Trifluoracetylgruppe, Phthalylrest, o-Nitrophenoxyacetylgruppe, Tritylgruppe, p-Toluolsulfonylgruppe, Benzylgruppe, im Benzolkern substituierte Benzylreste (p-Brom- oder p-Nitro-benzylrest), α -Phenyl-ethylrest. Hierzu wird auch auf das Buch von Jesse P.
25 Greenstein und Milton Winitz, Chemistry of Amino Acids, New York 1961, John Wiley and Sons, Inc., Volume 2, beispielsweise Seite 883 und folgende sowie The Peptids, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meienhofer, Academic from New York, Tabelle III und IV verwiesen. Diese Schutzgruppen kommen grundsätzlich auch für den Schutz von weiteren funktionellen Seitengruppen (OH-Gruppen, NH₂-Gruppen) der in Frage kommenden Aminosäuren in Frage.

30 Vorhandene Hydroxygruppen (Serin, Threonin) werden vorzugsweise durch Benzylgruppen und ähnliche Gruppen geschützt. Weitere nicht α -ständige Aminogruppen (zum Beispiel Aminogruppen in w-Stellung; Guanidinogruppe des Arginins) werden vorzugsweise mit Nitro-Gruppen geschützt.

Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren miteinander erfolgt nach den hierfür üblichen Methoden. Insbesondere kommen in Frage:

35 Methode der symmetrischen Anhydride (in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid), Carbodiimid-Methode, Carbodiimid-Hydroxybenzotriazol-Methode (siehe The Peptids, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meienhofer).

Für die Verknüpfung von Arginin wird vorzugsweise die Carbodiimid-Methode benutzt, für die Verknüpfung von Asparagin sowie von Glutamin wird vorzugsweise die Carbodiimid-Hydroxy-benzotriazol-Methode
40 benutzt (siehe The Peptids, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meienhofer). Für die übrigen Aminosäuren wird im allgemeinen die Methode der symmetrischen oder gemischten Anhydride benutzt.

Die Herstellung von Peptiden gemäß Anspruch 1, worin jedoch R⁵ D-Orn oder D-Lys ist (Ausgangsstoffe für die Umsetzung mit Cyanat) kann beispielsweise durch den angegebenen stufenweisen
45 Peptid-Aufbau oder durch Fragmentkondensation erfolgen.

Wenn erfindungsgemäße Peptide hergestellt werden, worin R⁵ Cit(Q) oder Hci(Q) ist, wird im allgemeinen bei der Peptidsynthese das entsprechende an der endständigen Ureidogruppe durch die Alkylgruppe Q substituierten Cit oder Hci eingesetzt.

Das Überführen der Peptide I in ihre Säureadditionssalze kann durch Umsetzen derselben mit Säuren
50 in an sich bekannter Weise bewerkstelligt werden. Umgekehrt kann das Freisetzen der freien Peptide durch Umsetzen ihrer Säureadditionssalze mit Basen durchgeführt werden.

Bei dem Herstellungsverfahren handelt es sich also zum Beispiel um ausschließliche Festphasentechniken, um teilweise Festphasentechniken, um Fragmentkondensation oder um klassische Lösungsphasensynthese. (Siehe M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, 1984).

55 Zum Beispiel sind die Methoden der ausschliesslichen Festphasensynthese im Lehrbuch "Solid Phase Peptide Synthesis", J.M. Stewart and J.D. Young, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill., 1984 (2. Ausgabe), G. Barany und R.B. Merrifield, "The Peptides", Ch.1, S. 1-285, 1979, Academic Press, Inc. beschrieben.

Klassische Lösungssynthese ist ausführlich in der Behandlung "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl). Synthese von Peptiden". E. Wunsch (Herausgeber) (1974), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, BRD, beschrieben.

Derartigen Synthesen ist gemein, dass die reaktiven Seitenkettenfunktionsgruppen der verschiedenen Aminosäureresten mit angebrachten Schutzgruppen geschützt werden, die eine chemische Reaktion an dieser Stelle verhindern wird, bis die Gruppe endgültig entnommen ist. Im allgemeinen ist ihnen auch der Schutz einer alpha-Aminogruppe auf einer Aminosäure oder einem Fragment gemein, während das Ganze an der Carboxylgruppe reagiert, worauf die selektive Entnahme der alpha-Aminoschutzgruppen folgt, um die darauffolgende Reaktion an dieser Stelle stattfinden zu lassen. Demgemäss ist es ihnen ebenfalls gemein, ein Zwischenprodukt als eine Stufe der Synthese herzustellen, das jedes der Aminosäurereste umfasst und an seiner gewünschten Sequenz in der Peptidkette angebracht ist, wobei die Seitenkettenschutzgruppen mit den passenden Resten verbunden werden.

Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können durchgeführt werden, indem eine Vielzahl von Unterstützungsphasen verwendet werden. Diese Unterstützungsphasen können zum Beispiel Harze wie Benzhydrylaminharze (angebrachterweise 2% netzverbunden), p-Methylbenzhydrylaminharze (angebrachterweise 2% netzverbunden) oder ähnliches.

In Formel II:

sind R¹, R² und R³ weiter oben näher beschrieben,

X[•] ist Wasserstoff oder eine Acylgruppe, die von geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen abgeleitet sind, oder eine alpha-Aminoschutzgruppe. Die alpha-Aminoschutzgruppen vorgesehen durch X[•] sind jene, die aus dem Stand der Technik für die stufenweise Synthese für Polypeptide wohlbekannt sind. Unter den Klassen von alpha-Aminoschutzgruppen, die als X[•] verwendet werden können, können Fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) oder t-Butoxycarbonyl (Boc) genannt werden.

X⁴ kann eine angebrachte Schutzgruppe für die Hydroxylgruppe des Ser wie zum Beispiel Benzyl (Bzl) und 2,6-Dichlorbenzyl (DCB) sein. Die bevorzugte Schutzgruppe ist Bzl.

X⁵ kann eine angebrachte Schutzgruppe für die Phenylhydroxylgruppe von Tyr wie zum Beispiel Bzl, 2-Br-Z und 2,6-Dichlorbenzyl (DCB) sein. Die bevorzugte Schutzgruppe ist DCB.

X⁶ ist eine angebrachte Schutzgruppe für die Seitenkettenaminogruppe von Lys oder Orn. Beispielfhaft für angebrachte Seitenkettenaminoschutzgruppe sind Benzyloxycarbonyl (Z) und 2-Chlorbenzyloxycarbonyl [Z-(2-Cl)].

X⁸ ist eine angebrachte Schutzgruppe für die Guanidinogruppe von Arg, wie zum Beispiel Nitro, Tos, Methyl-(t-Butylbenzyl)-sulfonyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzylsulfonyl; Tos ist die bevorzugte Gruppe.

X^{••} ist eine die Amidgruppe schützende Benzhydryl- oder Methylbenzhydrylgruppe, die in ein hierfür übliches Trägerharz eingebaut ist (zum Beispiel 98% Styrol-2%-divinylbenzol Copolymerisat, welches Benzhydrylamin- oder Methylbenzhydrylamingruppen enthält).

Die Wahl einer Seitenkettenaminoschutzgruppe ist nicht kritisch, es sei denn, es wird im allgemeinen eine ausgewählt, die im Verlauf der Entfernung der alpha-Aminoschutzgruppen während der Synthese nicht entnommen wird.

Die Peptide der Formel I werden aus Zwischenpeptidharzen der Formel II durch aus dem Stand der Technik bekannte Methoden hergestellt.

Die Festphasensynthese der Zwischenpeptidharze der Formel II wird im wesentlichen wie bei Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, S. 2149 (1963) beschrieben durchgeführt. Festphasensynthese beginnt am C-Terminal-Ende des Peptids durch Koppeln einer geschützten α -Aminosäure an ein angebrachtes Harz.

Derartiges Ausgangsmaterial kann hergestellt werden, indem α -Amino geschütztes Gly oder D-Ala durch eine Amidbindung an einen Benzhydrylaminharz gebunden wird. Derartige Trägerharze sind allgemein im Handel erhältlich und werden im allgemeinen verwendet, wenn das gewünschte, zu synthetisierende Polypeptid am C-Terminal ein α -Carboxyamid aufweist.

In einer Ausführungsform der Synthese wird die primäre Aminogruppe von Gly oder D-Ala mit einem t-Butoxycarbonylierenden Wirkstoff geschützt und das Koppeln wird durchgeführt, indem man irgendeine der bekannten Dialkylcarbodiimid-Koppel-Verfahren verwendet.

Die Auswahl eines angebrachten Koppelreagens ist dem Fachmann bekannt. Ein besonders angebrachter Koppelreagens ist N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC).

Aktivierende Reagenzien und ihre Verwendung bei der Peptidkopplung sind in M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, 1984 beschrieben.

Jede geschützte Aminosäure oder Aminosäuresequenz wird in den Festphasenreaktor mit ungefähr doppeltem Ueberschuss eingeführt, und das Koppeln kann in einem Medium von DMF:CH₂Cl₂ (1:1) oder in CH₂Cl₂ allein durchgeführt werden. In Fällen, bei denen unvollständiges Koppeln auftritt, wird das Koppel-

verfahren wiederholt, bevor die alpha-Aminoschutzgruppe vor dem Koppeln mit der nächsten Aminosäure entnommen wird. Der Erfolg der Koppelreaktion in jeder Stufe der Synthese wird vorzugsweise durch Ninhydrinreaktion wie bei E. Kaiser, et al., Anal. Biochem., **34**, 595 (1970) beschrieben überprüft.

Nachdem die gewünschte Aminosäuresequenz der Peptidharze der Formel II vervollständigt wurde, wird die Boc-Gruppe am Terminal entfernt und, wenn erwünscht, eine N-Terminal-Acylierung durchgeführt, indem ein angebrachtes Acylanhydrid oder Säurechlorid in einem 50-fachen Ueberschuss in einem halogenierten Kohlenwasserstofflösungsmittel verwendet wird; angebrachterweise Essigsäureanhydrid in Methylenchlorid während 30 Minuten. Das Zwischenpeptid kann aus dem Trägerharz entnommen werden, indem es mit einem Reagens wie zum Beispiel flüssiges Wasserstofffluorid behandelt wird, das nicht nur das Peptid vom Harz spaltet, sondern auch alle übrigen Seitenkettenschutzgruppen X^4 , X^5 , X^8 , X^{10} und, falls vorhanden X^6 spaltet.

Wird für die Spaltung Wasserstoff-Fluorid verwendet dann sind im Reaktionsröhrchen Anisol oder M-Cresol oder wenn erwünscht Methyläthylsulfid als Spülmittel vorhanden.

Die Überführung von Peptiden II, worin R^6 D-Lys oder D-Orn und X^6 Wasserstoff ist in Peptide I mittels Cyanat, ist in den vorhergehenden Seiten beschrieben.

Wenn die Acylierung ausgelassen wird, führt die Behandlung von Peptidharze der Formel II mit Wasserstofffluorid zu Dekapeptiden, welche freie omega-Amino und/oder alpha-Aminogruppen aufweisen und Formel II entsprechen, worin X_1 , X^4 , X^5 , X^8 , X^{10} und, falls vorhanden, X^6 , Wasserstoff sind. Diese freien Peptide werden in Peptide der Formel I umgewandelt, worin X eine Carbamoylgruppe ist, und zwar durch Behandlung von Cyanat, angebrachterweise Alkalimetallcyanat, vorzugsweise Kaliumcyanat. Die letztgenannte Reaktion, d.h. Umwandlung von H_2N in $H_2N-CO-NH$ am Aminoterminal der Peptide und die Umwandlung der Orn/Lys-Reste in die Cit/Hci-Reste kann leicht durch HPLC mittels MeCN-wässrige TFA-Systeme wegen einer charakteristischen 2-3-minütigen Erhöhung der Rückhaltezeiten der carbamoylierten Peptide beobachtet werden, d.h. Verbindungen mit der $H_2N-CO-NH$ -Gruppe, in bezug auf ihre mit der H_2N -Gruppe verwandten Verbindungen.

Alternativ und bevorzugt werden Peptide I, worin X = Acyl oder Carbamoyl ist direkt aus Zwischenpeptid-Harzen der Formel II, worin X_1 Acyl oder Carbamoyl und R^6 D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) ist, erhalten durch Spaltung und Abspaltung von Schutzgruppen.

Obwohl eine ausschliessliche Festphasensynthese und eine teilweise Festphasensynthese der Verbindungen der Formel I ebenfalls hierin beschrieben wird, kann die Herstellung der Verbindungen auch mit Hilfe von klassischen Lösungsphasenmethoden hergestellt werden.

Die wie in den Beispielen beschrieben hergestellten, synthetischen Peptide werden mit zwei der potentesten, in letzter Zeit beschriebenen LHRH-Antagonisten verglichen, nämlich [Ac-D-Phe(4-Cl)]^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰]LHRH (ORG-30276) (Coy, et al., Endocrinology, **100**, 1445, 1982) und [Ac-D-Nal(2)]¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶]LHRH (ORF 18260) (Rivier, et al., In: Vickery, B.H., Nestor, Jr., J.J. Hafez, E.S.E. (Eds.), "LHRH and Its Analogs", S. 11-22, MTP Press, Lancaster, UK, 1984), und es wurde festgestellt, dass sie ähnlich hohe Hemmwirkungen sowohl in vitro als auch in vivo aufwiesen, allerdings mit der Ausnahme, dass sie im Gegensatz zu den Kontrollpeptiden keine in vivo oedematöse Wirkungen zeigten.

Die hormonale Wirksamkeiten in vitro wurden verglichen mit superfundierten Zellsystemen der Hirnanhangsdrüse von Ratten (S. Vigh and A.V. Schally, Peptides, **5** suppl. 1: 241-247, 1984) bei denen die Wirksamkeit von LHRH (und anderen freisetzenden Hormonen) kann genau festgestellt werden, da die Menge des LH (oder anderer Hirnanhangsdrüsenhormone), die in das ausströmende Medium abgegeben wird, nicht nur proportional zur Hormon freisetzenden Potenz der angewandten Peptide ist, sondern ebenfalls leicht messbar anhand von gut beschriebenen Radioimmunotests ist.

Um die Potenz eines LHRH-Antagonisten zu bestimmen, werden Mischungen, die LHRH in einer gleichbleibenden Konzentration (herkömmlicherweise 1 nM) und den Antagonisten in wechselnden Konzentrationen enthalten, für das Superfundieren verwendet, um das Molekularverhältnis des Antagonisten zum LHRH zu bestimmen, bei dem das Wirken des LHRH vollständig blockiert ist. Diese Verhältnisse sind ungefähr 5 für beide Peptide der vorliegenden Erfindung und die Vergleichspeptide, wenn das Zellsystem der Hirnanhangsdrüse der Ratte zuvor mit Antagonisten während 9 Minuten vorinkubiert wird.

Bei einem in vivo Ovulationshemmungstest (A. Corbin and C.W. Beattie, Endocr. Res. Commun., **2**, 1-23, 1975; D.H. Coy, et al., Endocrinology, **100**, 1445, 1982) wurden bei den erfindungsgemässen Peptiden ebenfalls festgestellt, dass sie ungefähr gleich wirksam sind, wie der Kontrollantagonist, nämlich 87,5 - 100% Hemmung der Ovulation kann bei einer subkutan verabreichten Dosis von 1-3 µg/Ratte für jedes Peptid beobachtet werden.

Beim oedematischen Versuch von Schmidt, et al. (Contraception, **29**, 283-289, 1984) konnte jedoch ein ausgeprägter Unterschied zwischen den Kontrollpeptiden und den erfindungsgemässen Peptiden festge-

stellt werden. Die Kontrollpeptide bewirken Oedeme im Gesicht und auf den Extremitäten, wenn diese Ratten subkutan in Dosen von 1,25 oder 1,5 mg/kg verabreicht wurden. Bei den erfindungsgemässen Peptiden konnten keine derartige Reaktion beobachtet werden, wenn sie subkutan in einer Dosis von 1,5 mg/kg verabreicht wurden.

- 5 In den durchgeführten Versuchen wurden die Ratten in drei Gruppen zu je fünf Ratten pro Gruppe und pro untersuchter Verbindung eingeteilt. Ein Vergleich wurde angestellt mit einer bekannten Verbindung aus dem Stand der Technik mit der Bezeichnung ORG 30276 (N-Ac-D-p-Cl-Phe^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala⁷). Einmal pro Tag an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde den Gruppen subkutan LHRH-Antagonisten mit einer Dosierung von 1,5 mg/kg injiziert. Einer Kontrollgruppe wurde nur Verdünnungsmittel injiziert. Die Ratten wurden während 5 Stunden pro Tag beobachtet. Die Reaktionen der Ratten wurden wie folgt klassifiziert: NR keine sichtbare Reaktion, PR teilweises Ansprechen: Oedeme im nasal und paranasalen Bereich, FR vollständiges Ansprechen: Oedem im Gesicht mit oedematösen Extremitäten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 unten zusammengefasst.

Tabelle 1

LHRH Antagonist	1. Tag			2. Tag		
	NR	PR	FR	NR	PR	FR
ORG 30276	3	7	0	0	0	10
Kontrolle	9	0	0	9	0	0
Beispiel I	8	0	0	8	0*	0
Beispiel III	8	0	0	8	0	0
Beispiel IV	9	0	0	9	0	0
Beispiel V	9	0	0	8	1*	0
Beispiel XX	9	0	0	8	1*	0
Beispiel XXI	9	0	0	9	0	0
Beispiel XXVI	8	0	0	8	0	0
Beispiel XXVII	9	0	0	9	0	0

* sehr geringes Gesichtsoedem

- 35 Alle dargestellten Peptide sind vollständig wirksam bei der Hemmung der LHRH-Ausschüttung in einigermaßen vernünftigen Konzentrationen *in vitro*, obwohl die meisten etwas weniger potent sind als die vorliegenden *in vitro*-Standards; allerdings sind diese Peptide *in vivo* viel potenter.

- Dies wurde bei einem Versuch über die Histamin-Freisetzung *in vitro* aus den Bauchfell-Mastzellen gezeigt, der in Übereinstimmung mit dem Verfahren nach Morgan et al. (Int. Archs. Allergy appl. Immun. 80, 70, 1986) durchgeführt wurde.

In vitro Freisetzung von Histamin

- 45 Bei diesem Versuch wurden Ratten mit Aether narkotisiert und Bauchhöhlenexsudatzellen wurden geerntet, indem sie mit 12 ml Mastzellenmedium (MCM), (150 mM NaCl; 3 mM KCl; 3,0 mM Na₂HPO₄; 3,5 mM KH₂PO₄; 0,98 mM CaCl₂; 5,6 mM Dextrose, 0,1%iges Kalbsserumalbumin; 0,1%ige Gelatine und 10 E/ml Heparin) [9] gewaschen wurden. Zellen von 4 oder 5 Ratten wurden gesammelt, bei 120 G zentrifugiert, mit MCM auf eine Konzentration von 0,5 x 10⁶ ml resuspendiert und 1 ml wurde in 12 x 75 mm Polyäthylen-Röhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden während 15 min. auf 37 °C ausgeglichen und allein (Hintergrundfreisetzung von Histamin) mit 48/80 (positive Kontrolle) (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) oder mit angebrachten Konzentrationen (1 ng bis 10 µg/ml) an LHRH-Antagonisten während 60 min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Röhrchen auf 4 °C beendet. Die Röhrchen wurden zentrifugiert; die Ueberstände wurden entfernt und bei -20 °C gelagert, bis sie nach Histamin untersucht wurden. Die Versuche wurden doppelt durchgeführt. Das gesamte Zellhistamin wurde durch Sieden während 10 min. festgestellt. Das in Reaktion auf den Antagonisten ausgeschüttete Histamin wurde als Prozentsatz der gesamten Ausschüttung ausgedrückt. Diese Konzentrationen, die in ungefähr 50% des gesamten Mastzellen-Histamins (HRD₅₀ µg/ml) ausgeschüttet wurde, wurde für jeden Antagonisten be-

stimmt. Die Ergebnisse wurden in Figur 1 zusammengefasst.

Bei allen Peptiden wurde eine Wirksamkeit bei der Hemmung der Ovulation bei weiblichen Säugetieren bei sehr niedrigen Dosen festgestellt. Die Peptide der vorliegenden Erfindung wurden oft in Form von pharmazeutisch annehmbaren, nicht toxischen Salzen, wie zum Beispiel Säureadditionssalzen, verabreicht. Beispiele für derartige Säureadditionssalze sind Hydrochloride, Hydrobromide, Sulfat, Phosphat, Fumarat, Glukonat, Tannat, Maleat, Acetat, Citrat, Benzonat, Succinat, Alginat, Pamoat, Malat, Ascorbat, Tartrat und ähnliche. Wenn der Wirkstoff in Tablettenform verabreicht wird, kann die Tablette ein pharmazeutisch annehmbares Verdünnungsmittel, das ein Blindmittel wie zum Beispiel Tragant, Maisstärke oder Gelatine umfasst, enthalten; Zerfallmittel wie Alginsäure und ein Gleitmittel wie Magnesiumstearat.

Wenn Verabreichung in flüssiger Form erwünscht wird, kann ein Süßmittel und/oder Geschmackstoff als Teil des pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittels verwendet werden, und bei intravenöser Verabreichung wird diese in isotonischer Saline, Phosphatbufferlösungen oder ähnlichem durchgeführt.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen werden herkömmlicherweise das Peptid in Zusammenhang mit einem üblichen, pharmazeutisch annehmbaren Träger enthalten. Üblicherweise wird die Dosis von ungefähr 1 bis 100 Mikrogramm des Peptids pro Kilogramm Körpergewicht des Wirts bei intravenöser Verabreichung betragen; die oralen Dosen werden höher sein. Im allgemeinen wird die Behandlung von Versuchspersonen mit diesen Peptiden auf die gleiche Art und Weise durchgeführt wie die klinische Behandlung mit anderen LHRH-Antagonisten.

Diese Peptide können Säugetieren intravenös, subkutan, intramuskulär, oral, intranasal oder intravaginal verabreicht werden, um die Fruchtbarkeithemmung und/oder -Kontrolle zu erreichen und ebenfalls bei Anwendungen, die einer reversiblen Unterdrückung der gonadalen Aktivität bedürfen, wie zum Beispiel bei der Behandlung von vorzeitiger Pubertät oder während Bestrahlungs- oder Chemotherapie. Wirksame Dosen variieren je nach Verabreichungsform und den jeweiligen zu behandelnden Säugetierarten. Ein Beispiel einer typischen Dosierungsform ist eine physiologische Salinenlösung mit Peptid, die in einer Dosis von ungefähr 0,1 bis 2,5 mg/kg Körpergewicht verabreicht wird. Die orale Verabreichung des Peptids kann entweder in fester oder flüssiger Form durchgeführt werden.

Obwohl die Erfindung im Hinblick auf die bevorzugte Ausführungsform beschrieben worden ist, sollte es selbstverständlich sein, dass Wechsel und Abänderungen, die für den Fachmann offensichtlich sind, gemacht werden können, ohne dass der durch die beiliegenden Patentansprüche begrenzten Erfindungsbe- reich verlassen wird. Substitutionen aus dem Stand der Technik, die nicht wesentlich von der Wirksamkeit abweichen, können ebenfalls in der Erfindung verwendet werden.

SB-030, SB-075 und SB-088 sind Dekapeptide wie unten näher beschrieben, die besonders vorteilhafte Wirksamkeiten aufweisen:

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-R³-Ser-Tyr-R⁶-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

SB-030, R³ = D-Trp, R⁶ = D-Cit;

SB-075, R³ = D-Pal, R⁶ = D-Cit;

SB-088, R³ = D-Pal, R⁶ = D-Hci.

Von den enthaltenen Aminosäuren der Bestandteile sind D-Pal, D-Cit und D-Hci nicht im Handel erhältlich. Für D-Pal wird eine völlige Synthese benötigt, die mit Diäthylacetamidomalonat und 3-Picolylchlorid beginnt und auf bekannte Weise durchgeführt wird. D-Cit und D-Hci können leicht aus im Handel erhältlichen Diaminosäuren, wie zum Beispiel D-Orn bzw. D-Lys, hergestellt werden.

Jedes Peptid weist eine hohe LHRH-Hemmwirksamkeit wie unten gezeigt auf und ist völlig frei von oedematogenischen Nebenwirkungen.

Tabelle 1.

LHRH-Hemmwirksamkeiten von SB-030, SB-075 und SB-088				
Peptid	% Hemmung von LHRH (3nM) mit equimolärem Peptid		Ovulationshemmungsversuch	
	bei 0 min.	nach 2 Std.	Dosis (ug)	%Hemmung
SB-030	83	58	1.5	50
			3.0	100
SB-088	86	60	1.5	66
			2.0	83
			3.0	100
SB-075	89	54	1.5	75
			2.0	100

Abkürzungen: Die Aminosäuren und Schutzgruppen werden wie von der IUPAC IUB JCBN [Eur. J. Biochem. 138, 9-37 (1984)] empfohlen abgekürzt. Andere Abkürzungen sind: Boc₂O, di-t-Butyldicarbonat; DCM, Dichlormethan; TLC, TLE, Dünnschichtchromatographie; Elektrophorese auf Kieselgel-Platte.

SB-030 weist gegenüber SB-075 und SB-088 den Vorteil auf, dass es nur eine ungewöhnliche Aminosäure, nämlich D-Cit, umfasst. Andererseits weist sowohl SB-075 als auch SB-088 eine höhere Potenz und bessere Wasserlöslichkeit als SB-030 auf.

Die Beobachtungen und Versuche, die während der Synthese von SB-030, SB-075 und SB-088 gemacht worden sind, können wie folgt zusammengefasst werden:

Die Festphasensynthese von SB-030, SB-075 und SB-088 auf einem Benzhydrylaminharz unter Verwendung des Boc-Protokolls wird beschrieben. Dieses Vorgehen ist für die Ansammlung dieser Peptide völlig ausreichend, da es die schrittweise Kettenverlängerung durch das Carboxylterminal beinhaltet, um bedeutende Racemisierung während der Amidbindungsbildung zu vermeiden und ebenfalls die leichte Isolierung der Zwischenprodukte, die sich als besonders schwierig erweisen können während der Synthese von Fragmenten mit hydrophilischem Charakter (d.h. Fragmente 9-10 bis 5-10).

Die herkömmliche, stufenweise Synthese in einer Lösung ist natürlich auch eine angebrachte Methode zur Herstellung dieser Peptide, jedoch ist jenes Verfahren sich arbeits- und zeitaufwendiger.

AUSGANGSMATERIALIEN

Feststoffträger

Ein Benzhydrylaminharz mit 1,1 mAeq NH₂ g (Advanced ChemTech, Louisville, KY) wurde verwendet. Harze mit niedrigerem NH₂-Gehalt, z.B. 0,4-0,6 mAeq/g, können ebenfalls verwendet werden, sind aber natürlich weniger wirtschaftlich im Verbrauch.

Aminosäurenderivate

Die unten aufgeführten Boc-Aminosäuren wurden bei Bachem erstanden und ohne weitere Reinigung verwendet:

Boc-D-Ala, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu.H₂O,

Boc-D-Nal, Boc-D-Phe(4Cl), Boc-Pro,

Boc-Ser(Bzl), Boc-D-Trp und Boc-Tyr(DCB).

Boc-D-Cit, Boc-D-Hci und Boc-D-Pal, die nicht im Handel erhältlich sind, wurden gemäss der Literatur (1-4) mit geringfügigen Änderungen hergestellt.

Boc-D-Cit

5

Stufe 1, D-Cit

D-Orn (Sigma, 98%) wurde in D-Cit wie beschrieben (1) umgewandelt, mit Ausnahme davon, dass die Reaktionsmischung von (D-Orn)₂Cu und KOCN während 2 bis 3 Stunden gerührt wurde, um die Ablagerung einer Kruste aus (D-Cit, D-Orn)₂Cu auf der Behälterwand zu verhindern.

Die Reinheit des D-Cit wurde anhand von TLE (Dünnschichtelektrophorese) bei einem pH-Wert von 6,5 Pyridin-Essigsäure-Wasser (100:4:900) Puffer und bei 30 V/cm während 45 min. geprüft.

15 Stufe 2, Boc-D-Cit

6,6 g (30 mMol) Boc₂O in 15 ml Acetonitril wurde einer Lösung von 4,4 g (25 mMol) D-Cit in 25 ml Wasser und 12,6 ml (90 mMol) Triäthylamin beigelegt. Die Mischung wurde während 2 bis 3 Stunden gerührt. Danach wurde die Mischung einer TLC (Dünnschichtchromatographie) unterworfen, indem ein Lösungsmittelsystem aus Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser (60:10:3:6) verwendet wurde: Boc-D-Cit, D-Cit und Boc-D-Orn (Boc), die aus der D-Orn-Verunreinigung gebildet wurde, weisen RFs von jeweils 0,4, 0,0 und 0,9 auf. Die Mischung wurde verdünnt mit 25 ml Wasser und extrahiert mit Diäthyläther (2x20 ml) und Äthylacetat (2x20 ml), um den Überschuss an Dicarboxat und Boc-D-Orn(Boc)-Verunreinigung zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M KHSO₄ gesäuert und nach Beigabe von ungefähr 10 g Na₂SO₄ wurde die Phase mit Äthylacetat (3x30 ml) extrahiert. Kombinierte Äthylacetatlösungen (sorgfältig von der wässrigen Schicht getrennt) wurden unter Vakuum verdampft. Der Rest wurde in trockenem Dioxan verdünnt und dreimal unter Vakuum verdampft. Das dadurch gebildete leichte Öl wurde in 25 ml DMF verdünnt und zum Koppeln als mMol/ml dieser Grundlösung aus Boc-D-Cit verwendet.

Die Synthese des Boc-Cit unter Verwendung von Boc-Azid als Acylierungswirkstoff und die Herstellung des kristallinen Dicyclohexylaminsalzes wurden beschrieben (2).

Boc-D-Hci

35

Stufe 1, D-Hci

D-Hci wurde aus D-Lys.HCl (Sigma) in Analogie zu D-Cit (siehe oben und Verweis 1) hergestellt.

Stufe 2, Boc-D-Hci

6,6 g Di-tert-Butyldicarbonat verdünnt in 15 ml Acetonitril wurde einer Lösung aus 25 mMol (4,73 g) D-Hci in 25 ml Wasser und 12,6 ml (90 mMol) Triäthylamin beigelegt, und die Reaktionsmischung wurde während 2 bis 3 Stunden gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde anhand von TLC wie im Falle von Boc-D-Cit geprüft; die RFs für Boc-D-Hci, D-Lys und Boc-D-Lys(Boc) betrugen jeweils 0,3, 0,0 und 0,8. Die Reaktionsmischung wurde mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 M KHSO₄ gesäuert, und nachdem 10 g Na₂SO₄ beigelegt wurde, wurde sie mit einer 1:1-Mischung aus Äthylacetat und n-Butanol (4x30 ml) extrahiert. Die kombinierten, organischen Lösungen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und unter Vakuum verdampft. Der Rest wurde mit Diäthyläther trituriert, filtriert, mit Äther gewaschen, dann in Äthylacetat suspendiert und während 2 Stunden bei 20 °C gerührt und bei 0 °C nochmals für 2 weitere Stunden gerührt. Das so erhaltene, kristalline Material wurde abfiltriert, mit kaltem Äthylacetat gewaschen und getrocknet, um ungefähr 3,9 g Boc-D-Hci mit einem Schmelzpunkt von 141-142 °C (dec.) zu bilden.

Boc-D-Pal(3)

Stufe 1. Diäthylacetamido(3-pyridylmethyl)malonat (3) 113.0 g (60.3%) Diäthylacetamido(3-pyridylmethyl)malonat wurden aus 132.0 g Diäthylacetamidomalonat mit Hilfe des Verfahrens nach J.E. Rivier et al. (3) erhalten. Das rohe Material schmolz bei 95 °C. Eine kleine Probe wurde aus bei 104-106 °C geschmolzenem Wasser (Literatur 95 °C) rekristallisiert.

Stufe 2. N-Acetyl-3-(3-pyridyl)-DL-Alaninäthylester (4) 61.6 g (200 mMol) Diäthylacetamido(3-pyridylmethyl)malonat wurden in 210 ml ethanolischem NaOH in einer mit einem Stopfen versehenen Flasche verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Mischung unter Rückfluss gesetzt und auf dieser Temperatur während 30 min. gehalten. Die Mischung wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert, um die unlöslichen Feststoffe zu entfernen. Die unlöslichen Stoffe wurden mit verschiedenen kleinen Teilen von Aethanol gewaschen und dann weggeschüttet. Die kombinierten Filtrate wurden bis zur Trockenheit verdampft und der trockene Rest aus Wasser kristallisiert, indem 3-5 ml H₂O pro Gramm Feststoff verwendet wurden. 38.0 g (160 mMol, 80%) Wiedergewinn des Materials. Schmelzpunkt 124-126 °C (Literatur 118-121 °C).

Stufe 3. N-Acetyl-3-(3-pyridyl)-D-Alaninäthylester (3) 45.0 g (190 mMol) der oben beschriebenen DL-Mischung wurden in 225 ml heissem 4.5%igen HCl verdünnt. Diese Lösung wurde dann schnell auf 25 °C abgekühlt, um eine Suspension aus feinen Kristallen zu bilden. Der pH-Wert wurde auf 7.2 gebracht, indem 2 N KOH verwendet wurden und 150 mg alpha-Chymotrypsin dann beigelegt wurden, und der pH-Wert wurde dann bei 6.8-7.2 gehalten, indem tropfenweise 2 N KOH beigelegt wurden. Nachdem sich keine Änderung im pH-Wert während 15 min. gezeigt hat, wurden weitere 50 mg alpha-Chymotrypsin beigelegt, um sicher zu stellen, dass die Hydrolyse vollständig gelaufen ist. Es zeigte sich kein weiterer Wechsel im pH-Wert, nach dieser frischen Beigabe des Enzyms und der endgültige pH-Wert betrug 7.2. Diese Lösung wird mit 4x200 ml Aethylacetat extrahiert. Die Aethylacetat-Entzüge werden kombiniert, über Na₂SO₄ gerocknet, Trockenmittel ausfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rest wird aus Toluol (13-15 ml/g) rekristallisiert, um einen Wiedergewinn von 13.0 g (55 mMol, 57%) mit einem Schmelzpunkt von 79-81 °C (Literatur 122 °C) zu bilden.

Stufe 4. 3-(3-Pyridyl)-D-Alanin, D-Pal(3) (4) 13.0 g (55 mMol) N-Acetyl-3-(3-pyridyl)-D-Alaninäthylester werden über Nacht mit 100 ml 6 N HCl unter Rückfluss gesetzt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. 15 mg Aethanol wurden beigelegt und dieses wurde unter Vacuum entfernt. Diese Aethanolbehandlung wird zwei weitere Male wiederholt. Der Rest wird aus 90%igem Aethanol rekristallisiert, um 13.0 g (54 mMol, 98%) Amindihydrochlorid zu ergeben. Schmelzpunkt 237-239 °C (dec.) (Literatur 253-256 °C).

Stufe 5. N-Boc-3-(3-pyridyl)-D-Alanin, Boc-D-Pal(3) (3) 13.0 g (54 mMol) des oben beschriebenen D-Pal(3) wurden in 50 ml H₂O verdünnt. 50 ml Tetrahydrofuran und 30 ml (214 mMol) Triäthylamin wurden beigelegt. Dieser Mischung wurde während des Rührens in stündlichen Abschnitten 4x5 g-Teile Boc₂O (90.7 mMol) beigelegt. Nach dem Rühren während im ganzen 6 Stunden wird das Tetrahydrofuran unter Vakuum freigelegt. Ueberschüssiges Dicarboxat wird mit Hexan entfernt. Die wässrige Schicht wird mit 6 N HCl auf einen pH-Wert von 4 gebracht und dann mit 4x100 ml-Teilen Aethylacetat extrahiert. Das Aethylacetat wird kombiniert und 2x5 ml Teile der gesättigten Salzlösung rückextrahiert. Ueber Na₂SO₄ wird getrocknet, gefiltert und Lösungsmittel unter Vakuum freigelegt. Rest wird aus Toluol rekristallisiert, um 8.4 g (31 mMol, 57%) Boc-D-Pal(3) mit einem Schmelzpunkt von 141-142 °C (dec.) (Literatur 135-136 °C) zu ergeben.

HERSTELLUNG DES PEPTIDHARZES

Ein Reaktionsgefäß für manuelle Synthese von ungefähr 60 ml Fassungsvermögen wurde mit 1 g (1.1 mMol) Benzhydrylamin.HCl Harz gefüllt. Man liess während 2 Stunden in 20 ml DCM anschwellen und filterte dann. Danach wurden 15 ml 10%iges DIEA/DCM dem Harz beigelegt, während 2 min. geschüttelt und filtriert. Letztere Behandlung wurde zwei weitere Male wiederholt. Die Boc-Aminosäuren als vorgeformte HOBt-Ester wurden wie in Tabelle 2 dargestellt nach und nach an diesen Harzen gekoppelt. Stufen 1 - 12 bilden einen Kopplungszyklus für einen Aminosäurerückstand. Zehn nacheinanderfolgende Zyklen würden einen Dekapeptidamidharz mit freiem D-Nal(2)-Rest terminiert ergeben. Dieser Peptidharz wurde acetyliert wie in Stufen 2e und 2f beschrieben, dann aus dem Reaktionsgefäß entnommen, mit DCM und n-Hexan

gewaschen und unter Vakuum getrocknet, um 2,9-3,0 g des gewünschten Acetyl-Dekapeptidamid-Harzes (SB-088 wurde in einer kleineren Menge (0,1866 mMol) synthetisiert, das Peptidharz Nr. 3 und das rohe HF-Salz des erhaltenen freien Dekapeptids betragen jeweils 410 mg und 200 mg.) mit den folgenden Strukturen zu bilden:

5 1, Ac-d-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(DCB)-D-Cit-Leu-Arg(Tos)-Pro-D-Ala-NH-HARZ. für SB-030;

2, Ac-D-Nal(2)-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser(Bzl)-Tyr(DCB)-D-Cit-Leu-Arg(Tos)-Pro-D-Ala-NH-HARZ. für SB-075;

10 3, Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-Pal(3)-Ser(Bzl)-Tyr(DCB)-D-Hci-Leu-Arg(Tos)-Pro-D-Ala-NH-HARZ. für SB-088.

15 ²SB-088 wurde in einer kleineren Menge (0,1866 mMol) synthetisiert, das Peptidharz Nr. 3 und das rohe HF-Salz des erhaltenen freien Dekapeptids betragen jeweils 410 mg und 200 mg.

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 2. Syntheseprogramm

STUFE	REAGENS UND VERFAHREN	MISCH- ZEITEN IN MIN
1	vorbereiteter HOBT-Ester ³ , Koppeln	90
2	Ninhydrin-Test (5) ⁴ , wenn die K�gel- chen - mittelmässig oder stark blau sind werden Stufen 1 + 2 wiederholt, bei leicht blauer Färbung mit Stufen 2a- 2f weiterfahren	
2a	MeOH (10 ml), waschen	1
2b	10%iges DIEA/DCM (10 ml), Neutralization	2
2c	MeOH (10 ml), waschen	1
2d	DCM (10 ml), (dreimal) waschen	2
2e	Acetylimidazol ⁴ , Acetylisierung	30
2f	Ninhydrin-Test, wenn positiv, Stufen 2d - 2f wiederholen	
3	MeOH (10 ml), (zweimal) waschen	1
4	DCM (10 ml), (dreimal) waschen	2
5	50%iges TFA/DM (10 ml), entblocken	1
6	50%iges TFA/DM (10 ml), entblocken	30
7	IpOH (10 ml), waschen	1
8	10%iges DIEA/DCM (10 ml), Neutralization	3
9	MeOH (10 ml), waschen	1
10	10%iges DIEA/DCM (10 ml), Neutralization	3
11	MeOH (10 ml), waschen	1
12	DCM (10 ml), waschen	2

³Mit Ausnahme von Boc-D-Cit,

Boc-Aminosäure-HOBT-Estern wurden wie folgt hergestellt:

3 mMol Boc-Aminosäure [d.h. (in mg) D-Ala:568, D-Pro:646, Arg(Tos):1286, Leu:748, Tyr(DCB):1321, Ser(Bzl):886, D-Hci-865, D-Trp:913 ODER D-Pal(3):799, D-Phe(4Cl):899, D-Nal(2):946] und 460 mg (3 mMol) HOBT.H₂O wurden in 1 ml DMF gelöst, mit 2 ml DCM verdünnt, auf 0°C abgekühlt und mit 0,6 ml (3,8 mMol) DIC bei 0°C während 10 min. zum Reagieren gebracht; danach dem Harz mit 4x1 ml DCM-Spülung beigelegt. Für Boc-D-Cit wurde HOBT.H₂O in 3 ml Grundlösung aus Boc-D-Cit gelöst, mit Dic wie oben zum Reagieren gebracht, dann dem Harz mit 1x1 ml DMF und 3x1 ml DCM-Spülung beigemischt.

⁴Im Falle von Cit-enthaltenden Peptidharzen fällt der Test negativ aus, wenn die Kügelchen weiss sind (oder schwach gelb) und die Lösung lila gefärbt sind. Das vollständige Koppeln des Boc-Arg(Tos) an den Pro-Rest auf dem Harz kann geprüft werden, indem eine Isatinreagens (2,5 g Isatin, 20 g Phenol, 30 g Benzylalkohol und 2,5 g Boc-Phe) verwendet wird; der Test fällt negativ aus, wenn die Kügelchen weiss sind (oder leicht gelb aber nicht blau) nach 3 bis 4-maligem Waschen mit Aceton.

⁴0,34 g Imidazol gelöst in 2 ml DCM wurde mit 0,5 ml acetischem Anhydrid bei 0°C während 2 min. zum Reagieren gebracht und dann dem Harz mit 3x2 ml DCM-Spülung beigelegt.

Spaltung und Entschützung

Jeder Peptidharz wurde mit 3 ml M-Cresol und ungefähr 30 ml Wasserstofffluorid (HF) bei 0 °C während 45 min. behandelt. Nach der Entfernung des HF unter Hochvakuum, wurde der übrige Peptidharz mit trockenem Diäthyläther trituriert, filtriert, mit Diäthyläther gewaschen und das Peptid wurde dann mit folgendem extrahiert:

1. 50%ige, Essigsäure und DMF (2-2 x 20 ml) für SB-030;

2. 50%ige, Essigsäure (3 x 15 ml) für SB-075 und SB-088; und aus dem Harz durch Filtrieren getrennt. Die Peptidlösung wurde unter Vakuum verdampft und der Rest wurde mit Diäthyläther trituriert, filtriert, mit Diäthyläther gewaschen und getrocknet, um 1.2-1.3 g HF-Salz mit reinen Dekapeptiden² mit einer Reinheit von 70-85% zu bilden.

Reinigung

Das rohe Peptid wurde gereinigt, indem ein Beckman Prep-350 präparatives HPLC-System verwendet wurde. Die Trennungen wurden auf einer 41,5x250mm Dynamax-Säule erreicht, die mit sphärischem C₁₈ Keisegel gepackt war (300 Å Porengrösse, 12 µm Teilchengrösse) (RAININ Inc. Co. Woburn, MA).

Rohes SB-030 wurde auf der Säule in einer 30%igen, Ameisensäure Lösung angewandt, während rohes SB-075 und SB-088 in 30%iger, Essigsäure gelöst wurden. Druckgefälleelution wurde verwendet. Lösungsmittel A enthielt 0,1%iges, wässrige TFA und Lösungsmittel B war 0,1%iges TFA in 70%igem, wässrigem Acetonitril. Die Druckflussgeschwindigkeit betrug 35 ml/min. Die Säulenelution wurde anhand eines variablen Wellenlängen-UV-Detektors (Beckman Typ 163) bei 220 nm überwacht.

Der Betrag der reinen Dekapeptidamide und die allgemein erhaltenen Erträge waren die folgenden:

1. 600 mg (34%) SB-030,

2. 960 mg (52%) SB-075 und

3. 140 mg (45%) SB-088 (siehe Fussnote 2), mit einer Reinheit von >95%.

Analytisches HPLC

Die HPLC-Analyse wurde mit einem Hewlett-Packard Modell 1090 Flüssigchromatograph durchgeführt. Die Peptidproben wurden auf eine 4,6x250 mm W-Porex 5 µm, C₁₈-Säule (Phenomex, Rancho Palos Verdes, CA) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1.2 ml/min. unter Verwendung von Druckgefälleelution mit den Lösungsmitteln A und B chromatographiert (Chromatogramme der rohen Proben liegen bei).

Aminosäurenanalyse

Die Peptidproben wurden bei 110 °C während 20 Stunden in evakuierten, versiegelten Röhrchen unter Verwendung von 4 M methansulfonischer Säure mit 0,2% 3-(2-Aminoäthyl)indol hydrolysiert, und die Aminosäurezusammensetzung des Hydrolyzats wurde in einem Beckman 6300 Aminosäureanalysator bestimmt.

Die beiliegende Tabelle zeigt die Affinität der LHRH-Analoga für Hirnanhangsdrüse oder Rezeptoren der menschlichen Brustkrebsmembrane, wie bestimmt unter Verwendung von radioaktivmarkiertem LHRH oder radioaktivmarkiertem D-Trp⁵ LHRH.

Die Messungen mit radioaktivmarkiertem LHRH (A) zeigen, dass SB-075 die höchste Affinität für die Hirnanhangsdrüsenrezeptoren aufweist, d.h. die grösste Fähigkeit hat, LHRH zu verschieben, was eines der Hauptmerkmale für LHRH-Antagonisten ist. Andererseits scheint SB-088 eine besonders hohe Affinität für Rezeptoren der menschlichen Brustkrebsmembrane in beiden Versuchen (A + B) zu zeigen.

LITERATURVERWEIS

1 J.P. Greenstein and M. Winitz: Chemistry of the Amino Acids, John Wiley + Sons, New York, NY, 1961. (Cit: 2491 - 2494)

2 K. Eisele: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 845-854 (1975).

3 J.E. Rivier, J. Porter, C.L. Rivier, M Perrin, A. Corriogan, W.A. Hook, R.P. Siraganian and W.W. Vale: J. Med. Chem. 29, 1846-1851 (1986).

4 C. Hoes, J. Raap, W. Bloemhoff and K.E.T. Kerling: Recl. Trav. Chim. Pay-Bas 99, 99-104 (1980).

5 J.M. Stewart and J.D. Young: Solid Phase Peptide Synthesis, Second Edition. Pierce Chemical Company, Rockford Illionois, 1984⁶.

BEISPIEL I

10

Die Synthese des Peptids der Formel

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ erfolgt aus dem Zwischenpeptid Ac-D-Nal(2)-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

15 Dieses Zwischenpeptid wurde Schrittweise auf einem ca. 0,6 mAeq NH₂-g enthaltendem Benzhydrylaminharz auf einem Beckman 990 Synthesizer aufgebaut, indem mit Boc-D-Ala gemäss dem unten beschriebenen Verfahren begonnen wurde.

Koppeln wird gemäss Schema A wie folgt durchgeführt:

20

SCHEMA A	
Reagens	Mischzeit (Minuten)
1. Boc-Aminosäure (2-3 m Mol/g Harz) + Aeq. Menge von DIC	60 - 90
2. MeOH (zweimal)	1
3. CH ₂ Cl ₂ (zweimal)	1

25

Deblockierung wird gemäss Schema B wie folgt durchgeführt:

30

SCHEMA B	
Reagens	Mischzeit (min.)
4. 50%iges TFA/1%iges Aethanedithiol in CH ₂ Cl ₂ (zweimal)	15 + 15
5. IpOH/1%iges Aethandithiol	1
6. 10%iges TEA in CH ₂ Cl ₂	2
7. MeOH	1
8. 10%iges TEA in CH ₂ Cl ₂	2
9. MeOH (zweimal)	1 + 1
10. CH ₂ Cl ₂ (zweimal)	1 + 1

35

40

45 Zusammengefasst wird das Boc zum Schutz der alpha-Aminogruppen verwendet. Tos wird verwendet, um die Guanidinogruppe des Arg zu schützen. DCB wird als Schutzgruppe für die phenolische Hydroxylgruppe des Tyr verwendet, und die OH-Gruppe des Ser wird von Bzl geschützt. Ein zwei- bis dreifacher Ueberschuss der geschützten Aminosäure wird während zwei Stunden basierend auf dem NH₂-Gehalt des Benzhydrylaminharzes plus eines Aequivalents des DIC in CH₂Cl₂ oder 10-50%igem DMF:CH₂Cl₂ je nach Löslichkeit der Boc-Aminosäure verwendet.

50

Die N-Terminal-Acetylierung wird mit einem 50-fachen Ueberschuss an Essigsäureanhydrid in CH₂Cl₂ während 0,5 Stunden durchgeführt. Das so erhaltene, geschützte Zwischenpeptid weist folgende Zusammensetzung auf:

55

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser(X⁴)-Tyr-(X⁵)-D-Lys(X⁶)-Leu-Arg(X⁸)-Pro-D-Ala-NH-X¹⁰, worin X⁴ Bzl ist und X⁵ DCB, X⁶ Z(2-Cl), X⁸ Tos und X¹⁰ eine im Harz eingebaute Benzhydrylgruppe ist.

Um den geschützten Peptidharz zu spalten und entschützen, wird er mit 1,4 ml m-Cresol und 15 ml Wasserstofffluorid pro Gramm Peptidharz während 0,5 Stunden bei 0 °C und 0,5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Nach der Eliminierung des Wasserstofffluorids unter Hochvakuum wird der Peptidharz mit

Diäthyläther gewaschen und das Peptid wird dann mit DMF extrahiert und durch Filtern vom Harz getrennt. Die DMF-Lösung wird dann unter Hochvakuum auf ein kleines Volumen konzentriert und dann mit Diäthyläther trituriert. Das so erhaltene, rohe Produkt wird dann wie oben beschrieben durch vorbereitende HPLC gereinigt. Man erhält so das reine freie Zwischenpeptid der oben angegebenen Formel, worin X^4 , X^5 , X^6 , X^8 und X^{10} Wasserstoff bedeuten.

Das freie D-Lys(X^6)-enthaltende Zwischenpeptid wird dann bei Raumtemperatur mit Kaliumcyanat in 80 % wässrigem DMF umgesetzt (81 mg KCN/ml; Zeit: 24 Stunden). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum erfolgt Reinigung des Reaktionsproduktes durch präparative HPLC: man erhält so das gewünschte D-Hci-enthaltende Peptid.

Das so erhaltene D-Hci-enthaltende Peptid ist im wesentlichen (zu 95%) rein. Die HPLC-Analyse wird in einem Hewlett-Packard 1090A Gefälle-Flüssig-Chromatographie-System auf einer PHENOMENEX (W-Porex 5C18) Säule durchgeführt und mit Lösungsmitteln eluiert, wobei A: 0,1 %iges TFA, B: 0,1%iges TFA in 70%igem CH_3CN mit einem Gefälle von 30-60% in 30 Minuten. Das gewünschte Peptid weist eine HPLC-Rückhaltezeit (retention time) von 28,2 Minuten auf.

Die Reinigung der Peptide wird auf einem Beckmann Prep-350-Gefälle-Flüssig-Chromatograph durchgeführt, indem eine 41,4 x 250 mm Kartusche mit einer vorbereitenden, umgekehrten DYNEMAX C18-Phase (300A, 12 μm) mit Lösungsmitteln verwendet wird, wobei A: 0,1%iges TFA und B: 0,1%iges TFA in 70%igem CH_3CN ist und mit einer Druckgefälle von 45-60% in 30 Minuten. Das reine Peptid, in Form von TFA-Salz erhalten, kann falls erwünscht in die Acetatform umgewandelt werden, und zwar durch Führung durch eine AG3X (Bio-Rad)-Säule in die Acetatform mit nachfolgender Lyophilisierung.

BEISPIEL II

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala- NH_2

Die Herstellung erfolgt aus dem entsprechenden Zwischenpeptid, welches in 6-Stellung anstelle von D-Hci(Ethyl) die Aminosäure D-Lys enthält analog Beispiel I durch Umsetzung mit N-Ethyl-isocyanat (0,1 mg in 10 ml pro 1 g Zwischenpeptid) in DMF bei 0-10° C während 10 Stunden. Die Rückhaltezeit (retention time) ist 30,8 Minuten.

BEISPIEL III

Die Synthese des Peptids Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala- NH_2 wird wie in Beispiel I beschrieben durchgeführt. Das Ausgangspeptid enthält in 6-Stellung Boc-D-Orn(Z) anstelle von Boc-D-Lys[Z(2-Cl)], welches in Beispiel I verwendet wird. Dieses Ausgangspeptid wird analog Beispiel I hergestellt.

Rückhaltezeit 27,8 Minuten. Rückhaltezeit des Ausgangspeptids 25,5 Minuten.

BEISPIEL IV

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala- NH_2

Dieses Peptid wird aus Ac-D-Nal(2)-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala- NH_2 und N-Ethyl-isocyanat in DMF (0,1 mg in 10 ml pro Gramm Zwischenpeptid) bei 0-10° C analog Beispiel III erhalten.

Reaktionszeit 10 Stunden.

HPLC-Rückhaltezeit 30,4 Minuten.

BEISPIEL V

Die Synthese des Peptids Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ wird wie in Beispiel I beschrieben durchgeführt, mit Ausnahme davon, daß Boc-D-Phe(4-Cl) anstelle von Boc-D-Nal(2) in der Stellung 1 des Ausgangspeptids eingebaut wird, wobei dann als unmittelbares Ausgangspeptid Ac-D-Phe-(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ erhalten wird. Rückhaltezeit 26,6 Minuten; Rückhaltezeit des Ausgangspeptids mit Ac in 1-Stellung: 24,0 Minuten.

BEISPIEL VI

Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangspeptid ist Ac-D-Phe(4-Cl)-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (siehe Beispiel V), welches mit N-Ethyl-isocyanat (0,1 mg in 10 ml pro Gramm Ausgangspeptid) bei 0-10° C im DMF umgesetzt wird. Reaktionszeit 10 Stunden. HPLC-Rückhaltezeit: 29,2 Minuten.

BEISPIEL VII

Die Synthese des Peptids Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ wird wie in Beispiel I beschrieben durchgeführt, mit Ausnahme davon, daß Boc-D-Phe(4-Cl) anstelle des Boc-D-Nal(2) in 1-Stellung und Boc-D-Orn(Z) anstelle von Boc-D-Lys[Z(2-Cl)] in 6-Stellung eingebaut wird, so daß man als unmittelbares Ausgangspeptid Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (Rückhaltezeit 24,0 Minuten) erhält, welches dann analog Beispiel I mit KCNO umgesetzt wird. HPLC-Rückhaltezeit 26,3 Minuten.

BEISPIEL VIII

Ac-D-Phe-(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangspeptid ist Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (siehe Beispiel VII), welches mit N-Ethyl-isocyanat in DMF (0,1 mg in 10 ml pro Gramm Ausgangspeptid) bei 0-10° C während 10 Stunden umgesetzt wird.

HPLC-Rückhaltezeit 28,6 Minuten.

BEISPIEL IX

Die Synthese des Peptids Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ wird analog Beispiel I durchgeführt. Das erhaltene Peptid weist eine HPLC-Rückhaltezeit von 27,4 Minuten auf.

BEISPIEL X

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Ausgangszeptid ist: Ac-D-Nal(2)-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (siehe Beispiel IX), welches mit N-Ethyl-isocyanat in DMF (0.1 mg in 10 ml pro Gramm Ausgangszeptid) bei 0-10° C während 10 Stunden umgesetzt wird.
HPLC-Rückhaltezeit 30.0 Minuten.

BEISPIEL XI

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangszeptid ist: Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (Rückhaltezeit 16,8 Minuten), welches analog Beispiel I mit Kaliumcyanat umgesetzt wird. Das Ausgangszeptid wird analog Beispiel I erhalten mit Ausnahme, daß Boc-Pro anstelle von Boc-D-Nal(2) in 1-Stellung eingebaut wird.
HPLC-Rückhaltezeit 19,3 Minuten.

BEISPIEL XII

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangszeptid ist:
Ac-D-Pro-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (siehe Beispiel XI), welches mit N-Ethyl-isocyanat in DMF (0.1 mg in 10 ml pro Gramm Ausgangszeptid) bei 0-10° C während 10 Stunden umgesetzt wird.
HPLC-Rückhaltezeit 22 Minuten.

BEISPIEL XIII

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangszeptid ist: Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (Rückhaltezeit 16,85 Minuten), welches analog Beispiel I mit Kaliumcyanat umgesetzt wird. Das Ausgangszeptid wird ebenfalls analog Beispiel I erhalten mit dem Unterschied, daß Boc-Pro anstelle von Boc-D-Nal(2) in die 1-Stellung und Boc-D-Orn(Z) anstelle von Boc-D-Lys[Z(2-Cl)] in die 6-Stellung eingebaut werden.
HPLC-Rückhaltezeit 18,8 Minuten.

BEISPIEL XIV

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangspeptid ist: Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (siehe Beispiel XIII), welches analog Beispiel VI mit N-Ethyl-isocyanat umgesetzt wird.

5 HPLC-Rückhaltezeit 24,9 Minuten.

BEISPIEL XV

10

Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

15 Ausgangspeptid ist: Ac-D-Phe-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (Rückhaltezeit 20,8 Minuten), welches analog Beispiel I mit Kaliumcyanat umgesetzt wird. Das Ausgangspeptid wird analog Beispiel I erhalten, wobei jedoch in 1-Stellung anstelle von Boc-D-Nal(2) der Aminosäurerest Boc-D-Phe eingebaut wird.

HPLC-Rückhaltezeit 23,4 Minuten.

20

BEISPIEL XVI

25

Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

30 Ausgangspeptid ist: Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (siehe Beispiel XV), welches mit N-Ethyl-isocyanat in DMF (0,1 mg in 10 ml pro Gramm Ausgangspeptid) bei 0-10° C während 10 Stunden umgesetzt wird.

HPLC-Rückhaltezeit 26,0 Minuten.

35

BEISPIEL XVII

40 Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangspeptid ist: Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (Rückhaltezeit 21,0 Minuten), welches analog Beispiel I mit Kaliumcyanat umgesetzt wird. Herstellung des Ausgangspeptids erfolgt analog Beispiel I mit dem Unterschied, daß anstelle von Boc-D-Nal(2) in 1-Stellung Boc-D-Phe und anstelle von Boc-D-Lys[Z(2-Cl)] in 6-Stellung Boc-D-Orn(Z) eingebaut werden.

45 HPLC-Rückhaltezeit 23,1 Minuten.

BEISPIEL XVIII

50

55

Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(Ethyl)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Ausgangspeptid ist: Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (siehe Beispiel XVII), welches mit N-Ethyl-isocyanat in DMF (0.1 mg in 10 ml pro Gramm Ausgangs-peptid) bei 0-10 ° C während 10 Stunden umgesetzt wird
HPLC-Rückhaltezeit 25,4 Minuten.

BEISPIEL XIX

Beispiel für die allgemeine Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids der Formel Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

Dieses Peptid wird Schritt für Schritt mittels eines Benzhydrylaminharzes, welches ungefähr 1,0 mol äquivalente Aminogruppen pro Gramm enthält unter Verwendung eines Beckman 990 Synthesizers, wobei mit Boc-D-Ala begonnen wird. Die Kupplung erfolgt gemäß Schema A, welches in Beispiel I angegeben ist. Die D-Blockierung wird ausgeführt gemäß dem Schema B, welches in Beispiel I angegeben ist. Für die übrigen Bedingungen gelten die entsprechenden Angabe gemäß Beispiel I.

Das so erhaltene geschützte Zwischenpeptid hat die folgende Zusammensetzung:
Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser(X⁴)-Tyr(X⁵)-D-Hci-Leu-Arg(X⁸)-Pro-D-Ala-NHX¹⁰, wobei X⁴ = Bzl und X⁵ = Dzb, X⁸ = Tos und X¹⁰ eine Benzhydrylgruppe, die in dem Harz eingebaut ist, darstellt.

Die Spaltung des so erhaltenen geschützten Peptids erfolgt gemäß Beispiel I mit 1,4 ml m-Cresol und 15 ml Fluorwasserstoff pro Gramm Peptidharz (0,5 Stunden bei 0 ° C und 0,5 Stunden bei Raumtemperatur). Alle übrigen Maßnahmen wie in Beispiel I angegeben. Das erhaltene Rohprodukt wird durch preparative HPLC-Chromatographie gereinigt. Die HPLC-Analyse wird entsprechend Beispiel I in einem Hewlett-Packard 1090A, Gefälle-Flüssig-Chromatographie-System unter Verwendung einer Phenomenex-Säule ausgeführt mit folgenden Lösungsmitteln eluiert:

Lösungsmittel A: 0,1% TFA, Lösungsmittel B: 0,1% TFA in 70 % CH₃CN mit einem Gradienten von 35 - 75 % in 30 Minuten. Das erhaltene Dipeptid, welches in der 6-Stellung D-Hci enthält, hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 22,9 Minuten. Weitere Reinigung erfolgt auf einen Beckmann-Prep-350-Gefälle-Flüssig-Chromatograph entsprechend Beispiel I.

BEISPIEL XX

Das Peptid H₂N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ wird gemäß Beispiel XIX erhalten mit dem Unterschied, daß anstelle von Boc-D-Nal(2) in die 1-Stellung H₂N-CO-D-Nal(2) eingebaut wird und die N-terminale Acetylierung nicht erfolgt. HPLC-Rückhaltezeit 24,0 Minuten.

BEISPIEL XXI

Die Synthese des Peptids Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ wird wie in Beispiel XIX beschrieben durchgeführt mit Ausnahme davon, daß Boc-D-Cit anstelle von Boc-D-Hci in Stellung 6 eingebaut wird. Das gewünschte Peptid weist eine HPLC-Rückhaltezeit von 22,5 Minuten auf.

BEISPIEL XXII

Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Herstellung gemäß Beispiel XIX mit dem Unterschied, daß Boc-D-Phe(4-Cl) anstelle von Boc-D-Nal(2) in 1-Stellung eingebaut wird.

5 HPCL-Rückhaltezeit 24,0 Minuten.

BEISPIEL XXIII

10

Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

15 Die Herstellung erfolgt analog Beispiel XIX mit dem Unterschied, daß Boc-D-Phe(4-Cl) anstelle von Boc-D-Nal(2) in die 1-Stellung und Boc-D-Cit anstelle von Boc-D-Hci in 6-Stellung eingebaut wird.
Rückhaltezeit des erhaltenen Peptids 20,8 Minuten.

20

BEISPIEL XXIV

25 Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Die Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel XIX mit dem Unterschied, daß Boc-Gly anstelle von Boc-D-Ala in die 10-Stellung eingebaut wird.

Das erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 22,4 Minuten.

30

BEISPIEL XXV

35

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Herstellung erfolgt gemäß Beispiel XIX mit dem Unterschied, daß Boc-D-Pal(3) anstelle von Boc-D-Trp in die 3-Stellung eingebaut wird.

40 Das erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 13,6 Minuten.

BEISPIEL XXVI

45

Ac-D-Nal-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

50

Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel XIX mit dem Unterschied, daß Boc-D-Cit anstelle von D-Hci in die 6-Stellung und Boc-D-Pal(3) anstelle von Boc-D-Trp in die 3-Stellung eingebaut wird.

Das erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 13,3 Minuten.

55

BEISPIEL XXVII

Die Synthese des Peptids $\text{H}_2\text{N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$ wird wie in Beispiel XIX beschrieben durchgeführt mit dem Unterschied, daß Boc-D-Cit anstelle von Boc-D-Hci in Stellung 6 eingebaut wird, daß Boc-D-Pal(3) anstelle von Boc-D-Trp in Stellung 3 eingebaut wird und daß die N-terminale-Acetylierung ausgelassen wird.

Man erhält so das Zwischenpeptid:

$\text{H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$. Das so erhaltene, freie Peptid wird dann mit Kaliumcyanat in 80%igem wässrigen DMF (81 mg KOCN/300 mg Peptid/ml) bei Raumtemperatur während 24 Stunden umgesetzt. Nach Verdampfung unter Hochvakuum wird die Reaktionsmischung durch vorbereitende HPLC gereinigt. Das so erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 14,4 Minuten.

BEISPIEL XXVIII

$\text{H}_2\text{N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$ wird analog Beispiel XIX durchgeführt mit dem Unterschied, daß Boc-D-Pal(3) anstelle von Boc-D-Trp in Stellung 3 eingebaut wird, und daß die N-terminale-Acetylierung ausgelassen wird.

Man erhält das Zwischenpeptid

$\text{H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$. Das so erhaltene freie Peptid wird dann mit Kaliumcyanat in wässrigem DMF (81 mg KOCN/300 mg Peptid/ml) bei Raumtemperatur während 24 Stunden umgesetzt. Nach Verdampfung unter Hochvakuum wird die Reaktionsmischung durch präparative HPLC gereinigt. Das so erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 14,7 Minuten.

BEISPIEL XXIX

Die Synthese des Peptids $\text{H}_2\text{N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$ beginnt mit der Herstellung des Zwischenpeptids $\text{H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$. Die Synthese des Zwischenpeptids wird wie in Beispiel XIX beschrieben ist durchgeführt mit dem Unterschied, daß Boc-D-Orn(Z) in Stellung 6 anstelle von Boc-D-Hci eingebaut wird, und daß die N-terminale-Acetylierung ausgelassen wird. Das freie in 6-Stellung D-Orn enthaltende Peptid wird dann mit Kaliumcyanat in 80%igem wässrigen DMF (162 mg KOCN/300 mg Peptid/ml) bei Raumtemperatur während 24 Stunden umgesetzt. Nach Verdampfung unter Hochvakuum wird die Reaktionsmischung durch präparative HPLC gereinigt. Das so erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 23,6 Minuten.

BEISPIEL XXX

Die Synthese des Peptids $\text{H}_2\text{N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$ beginnt mit der Herstellung des Zwischenpeptids $\text{H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH}_2$. Die Synthese des Zwischenpeptids wird wie in Beispiel XIX beschrieben ist durchgeführt mit dem Unterschied, daß Boc-D-Lys[Z(2-Cl)] anstelle von Boc-D-Hci in Stellung 6 eingebaut wird, und daß die N-terminale-Acetylierung ausgelassen wird. Das freie Peptid, welches in 6-Stellung D-Lys enthält, wird dann mit Kaliumcyanat in 80%igem wässrigen DMF (164 mg KOCN/300 mg Peptid/ml) bei Raumtemperatur während 24 Stunden zum Reagieren gebracht. Nach Verdampfung unter Hochvakuum wird die Reaktionsmischung durch präparative HPLC gereinigt. Das so erhaltene Peptid hat eine HPLC-Rückhaltezeit von 14,0 Minuten.

BEISPIEL XXXI

Die Tablettenformulierung für die bukkale (z.B. sublinguale) Verabreichung:

- 5 1. LHRH-Antagonist 10,0 mg
 pressbarer Zucker 86,0 mg
 Kaliumstearat 4,0 mg
 2. LHRH-Antagonist 10,0 mg
 pressbarer Zucker 88,5 mg
 10 Magnesiumstearat 1,5 mg
 3. LHRH-Antagonist 5,0 mg
 Mannit 83,5 mg
 Magnesiumstearat 1,5 mg
 4. LHRH-Antagonist 10,0 mg
 15 Vorgelatinierte Stärke 10,0 mg
 Lactose 74,5 mg
 Vorgelatinierte Stärke 15,0 mg
 Magnesiumstearat, USP 1,5 mg

20 Verfahren A.

LHRH-Antagonist wird in einer ausreichenden Menge Wasser gelöst, um ein nasses Granulat zu bilden, wenn er mit dem Zuckeranteil des Trägers gemischt wird. Nach vollständigem Mischen wird das Granulat in einer Tropfschale einer Flüssigbett-Trockenvorrichtung getrocknet. Das trockene Granulat wird dann durchleuchtet, um eventuelle grossen Aggregate aufzuzeigen und diese zu zerkleinern und dann mit den übrigen Komponenten gemischt.

Das Granulat wird dann in einer Standard-Tablettenmaschine auf ein spezifisches Tablettengewicht zusammengepresst.

30

Verfahren B.

Bei dieser Herstellungsmethode enthalten alle Formulierungen 0,01%ige Gelatine. Die Gelatine wird zuerst im wässrigen Granulatlösungsmittel gelöst, dann wird der LHRH-Antagonist zugegeben. Die übrigen Stufen sind wie bei Methode A beschreiben.

40

BEISPIEL XXXII

45 Langwirkende, intramuskulär injektierbare Formulierung

Langwirkendes intramuskulär-injektierbares Semsamöl-Gel

50

LHRH-Antagonist 10,0 mg
 Aluminiummonostearat 20,0 mg
 Sesamöl ad 10 ml.

Das Aluminiummonostearat wird zusammen mit dem Sesamöl lange unter Rühren auf 125° C erhitzt, bis eine klare, gelbe Lösung erhalten wird. Diese Mischung wird dann im Sterilisationsapparat sterilisiert

55

und abgekühlt. Der LHRH-Antagonist wird dann aseptisch mit Hilfe von Triturierung beigelegt. Besonders bevorzugte LHRH-Antagonisten sind Salze mit niedriger Löslichkeit, z.B. Zinksalze, Zinkannatsalze, Pamoatsalze und ähnliche. Diese weisen eine aussergewöhnlich lange Aktivitätsdauer auf.

BEISPIEL XXXIII

Langwirkender intramuskulär-injektzierbare -bioabbaubare Polymer-Mikrokapseln

- 15 LHRH-Antagonisten 1%
25.75 Glycolid-Lactid Copolymer (Copolymerisat aus Glycolsäure und Milchsäure) (0.5 intrinsische Viskosität) 99%
Mikrokapseln (0-150 Angström) der oben genannten Formulierung suspendiert in:
Dextrose 5.0%
- 20 Carboxymethylcellulose-Natrium 0.5 %
Benzylalkohol 0.9%
Tween 80 0.1%
Wasser, gereinigt a.w. (soviel wie nötig für) 100.0%
25 mg Mikrokapseln werden in 1.0 ml des Vehikels suspendiert.

BEISPIEL XXXIV

Wässrige Lösung einer intramuskulären Injektion

- 35 LHRH-Antagonist 500 mg
Gelatine(nichtantigenisch) 5 mg
Wasser für die Injektionszwecke 100 ml
Die Gelatine und der LHRH-Antagonist werden im Injektionswasser aufgelöst. Danach wird die Lösung
- 40 steril gefiltert.

BEISPIEL XXXV

Formulierung zur rektalen Verabreichung

Suppositorvehikel zur rektalen Verabreichung

LHRH-Antagonist 5,0 mg

5 Witepsol H15 20,0 mg

Der LHRH-Antagonist wird mit dem geschmolzenen Witepsol H15 gemischt und in eine Gussform von 2 Gramm gegossen.

10 Ansprüche

1. Peptid der Formel:



15

worin

X eine Acylgruppe aus geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamoyl-Gruppe ist,

R¹ D- oder L-Pro, D- oder L-Δ³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-HI), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

20 R² D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist,

R³ D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R⁶ D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) ist und

R¹⁰ Gly oder D-Ala ist,

wobei HI Fluor, Chlor oder Brom und Q C₁-C₃-Alkyl ist, und pharmazeutisch annehmbaren Säureadditions-

25 salze davon.

2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

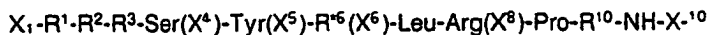
X eine Acetyl- oder Carbamoyl-Gruppe ist,

R¹ D-Nal(2), D- oder L-Pro, D-Phe oder D-Phe(4-Cl) ist,

R² D-Phe(4-Cl) oder D-Phe(4-F) und

30 R³ D-Trp oder D-Pal(3) ist.

3. Peptide der Formel:



35 worin

X₁ eine Acylgruppe aus geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen oder t-Boc, Wasserstoff oder Carbamoyl ist,

X⁴ Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die Ser-Hydroxylgruppe ist,

X⁵ Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die Tyr-Phenolhydroxylgruppe ist,

40 X⁶ eine Schutzgruppe für die Lys- oder Orn-Seitenkettenaminogruppe oder Wasserstoff ist,

X⁸ Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die Arg-Guanidinogruppe ist,

X¹⁰ Wasserstoff oder ein Trägerharz mit Benzhydryl- oder Methylbenzhydrylgruppen ist,

R¹ D- oder L-Pro-, D- oder L-Δ³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-HI), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R² D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist,

45 R³ D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R⁶ D-Cit, D-Hci, D-Lys oder D-Orn ist und

R¹⁰ Gly oder D-Ala ist,

wobei HI Fluor, Chlor oder Brom ist.

4. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

50 dadurch gekennzeichnet, dass

X Acetyl, Boc oder Wasserstoff ist,

X⁴ Benzyl ist,

X⁵ 2,6-Dichlorbenzyl ist,

X⁶ Benzyloxycarbonyl oder 2-Chlorbenzyloxycarbonyl ist,

55 X⁸ p-Toluolsulphonyl oder Nitro ist,

X¹⁰ ein Benzhydryl oder Methylbenzhydrylgruppen enthaltendes Trägerharz ist,

R¹ D-Nal(2) oder D-Phe(4-Cl) ist,

R^2 D-Phe(4-Cl) ist.

R^3 D-Trp oder D-Pal(3) ist.

R^{10} D-Ala ist.

5 5. Peptid nach einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß X oder X₁ Acetyl ist.

6. Peptid nach einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß X oder X₁ Carbamoyl ist.

7. Peptid nach einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R^6 oder R^6 D-Cit oder D-Hci ist.

10 8. Peptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass R^6 D-Lys oder D-Orn ist.

9. Verfahren zur Herstellung von Peptiden der Formel:



15 worin

X eine Acylgruppe aus geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamoyl-Gruppe ist.

R^1 D- oder L-Pro, D- oder L- Δ^3 -Pro, D-Phe, D-Phe(4-HI), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist.

R^2 D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist.

20 R^3 D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist.

R^5 D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) ist und

R^{10} Gly oder D-Ala ist.

wobei HI Fluor, Chlor oder Brom und Q C₁-C₃-Alkyl ist, und deren pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalzen.

25 dadurch gekennzeichnet, daß man sie durch in der Peptidchemie übliche Fragmentkondensation von entsprechenden Peptidbruchstücken oder durch in der Peptidchemie üblichen stufenweisen Aufbau herstellt oder daß man in einem Peptid der Formel I, worin R^6 D-Orn oder D-Lys ist, die freie Aminogruppe von D-Orn oder D-Lys durch Umsetzung mit einem Alkalicyanat oder einer Cyanat-liefernden Verbindungen oder einem C₁-C₃-Alkylisocyanat zur Ureidogruppe umsetzt und gegebenenfalls die erhaltenen Peptide acyliert und/oder in die Amide überführt und gegebenenfalls in physiologisch unbedenkliche Säuresalze überführt.

10. Verfahren nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß man den stufenweisen Aufbau durchführt, indem man zunächst die Carboxyterminale Aminosäure Glycin oder D-Alanin beziehungsweise deren Amide, deren α -ständige Aminogruppe geschützt ist, an einen hierfür üblichen synthetischen Träger kovalent bindet, die α -Amino-Schutzgruppe abspaltert, an die so erhaltene freie Aminogruppe die nächstfolgende geschützte Aminosäure über ihre Carboxy-Gruppe bindet, dann wiederum die α -Amino-Schutzgruppe dieser zweiten Aminosäure abspaltert, hieran die nächste Aminosäure bindet und in dieser Weise Schritt für Schritt die übrigen Aminosäuren des zu synthetisierenden Peptids in der richtigen Reihenfolge verknüpft und nach Verknüpfung aller Aminosäuren das fertige Peptid gemäß Anspruch 1 vom Träger abspaltert und gegebenenfalls weitere vorhandene
40 Seitenfunktions-Schutzgruppen abspaltert.

11. Verbindungen gemäß einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8 zur Anwendung als therapeutische Wirkstoffe.

12. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel I gemäß einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8 neben üblichen Träger- und/oder Verdünnungsbeziehungsweise
45 Hilfsstoffen.

13. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels,

dadurch gekennzeichnet,

50 daß eine Verbindung I gemäß einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8 mit gebräuchlichen pharmazeutischen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln beziehungsweise sonstigen Hilfsstoffen zu pharmazeutischen Zubereitungen verarbeitet beziehungsweise in eine therapeutisch anwendbare Form gebracht wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge an Wirkstoff gemäß einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8 zwischen 0,1 und 2,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag liegt.

55 15. Verwendung von Verbindungen gemäß einem oder mehreren der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung von Arzneimitteln.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

**0 299 402
A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88111031.6

(51) Int. Cl.⁵: C07K 7/20, A61K 37/43

(22) Anmeldetag: 11.07.88

(30) Priorität: 17.07.87 US 74126

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
18.01.89 Patentblatt 89/03

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 06.06.90 Patentblatt 90/23

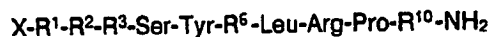
(71) Anmelder: ASTA Pharma Aktiengesellschaft
Weismüllerstrasse 45
D-6000 Frankfurt am Main 1(DE)

(72) Erfinder: Schally, Andrew V., Prof.
5025 Kawanee Avenue
Metairie, LA 70002(US)
Erfinder: Bajusz, Sandor, Dr.
10501 Curran Boulevard no. 5W
New Orleans, LA 70127(US)

(54) LHRH Antagonisten, deren Herstellung und entsprechende pharmazeutische Zubereitungen.

(57) LHRH-Antagonisten sind beschrieben, die eine verbesserte Wasserlöslichkeit aufweisen, und die während sie eine hohe antagonistische Wirksamkeit der basischen Peptide aufweisen, frei von oedematösen Auswirkungen sind. Diese Verbindungen sind hochwirksam in der Hemmung der Freisetzung von Gonadotropinen aus der Hirnanhangsdrüse von Säugtieren einschliesslich Menschen.

Die Verbindungen werden durch die folgende Formel wiedergegeben:



worin

X eine Acylgruppe aus geraden oder verzweigten Ketten aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamoyl-Gruppe ist,

R¹ D- oder L-Pro, D- oder L-³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-Cl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R² D-Phe oder D-Phe(4-HI) ist,

R³ D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) oder D-Nal(2) ist,

R⁶ D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) oder D-Hci(Q) und

R¹⁰ Gly oder D-Ala ist,

wobei HI Fluor, Chlor oder Brom und Q C₁-C₃-Alkyl ist,

und die pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze davon und Verfahren zur Verwendung in

bezug auf diese Verbindungen.

EP 0 299 402 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 11 1031

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	Z. NATURFORSCH., Band 42b, 1987, Seiten 101-106; K. FOLKERS et al.: "Activities of antagonists of the luteinizing hormone releasing hormone with emphasis on positions 1,5 and 6 and on positions 1,2 and 3" * Ganzes Dokument *	1-15	C 07 K 7/20 A 61 K 37/43
X	EP-A-0 081 877 (D.H. COY et al.) * Ganzes Dokument *	3-6,8, 11-15	
A		1,2,7,9 ,10	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 82, 1975, Seite 488, Zusammenfassung Nr. 73465h, Columbus, Ohio, US; Y. YABE et al.: "Analogues of luteinizing hormone-releasing hormone with modification in position 8", & CHEM. PHARM. BULL. 1974, 22(11), 2557-64	1-15	
P,X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Band 85, März 1988, Seiten 1637-1641; S. BAJUSZ et al.: "Highly potent antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone free of edematogenic effects" * Ganzes Dokument *	1,2,5-7 ,19-15	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4) C 07 K A 61 K
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 110, 1989, Seite 94, Zusammenfassung Nr. 186130k, Columbus, Ohio, US; S. BAJUSZ et al.: "New antagonists of LH-RH. II. Inhibition and potentiation of LH-RH by closely related analogs", & INT. J. PEPT. PROTEIN RES. 1988, 32(6), 425-35	1,2,5-7 ,9-15	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 13-03-1990	Prüfer GROENENDIJK M.S.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P0403)

PHARMACEUTICAL AEROSOL FORMULATION OF SOLID POLYPEPTIDE MICROPARTICLES AND METHOD FOR THE PREPARATION THEREOF

Patent Number: ☐ WO9116038

Publication date: 1991-10-31

Inventor(s): PLATZ ROBERT M (US); UTSUMI JUN (JP); SATOH YUICHIRO (JP); NARUSE NORIO (JP)

Applicant(s): TORAY INDUSTRIES (JP); PLATZ ROBERT M (US)

Requested Patent: ☐ JP5000963

Application Number: WO1991JP00486 19910412

Priority Number(s): JP19900098353 19900413

IPC Classification: A61K9/12; A61K9/14; A61K9/51; A61K9/72; A61K45/02

EC Classification: A61K9/00M20B, A61K38/20F, A61K38/21B

Equivalents: DE69126935D, DE69126935T, ☐ EP0477386 (WO9116038), B1

Cited Documents: EP0257956; EP0289336; EP0122036; WO8905158; EP0396903

Abstract

Disclosed is a pharmaceutical aerosol formulation of biologically active polypeptide which is a human interferon or a human interleukin, which is characterized by the fact that said polypeptide is in the form of solid micronized particles having a predetermined median diameter. An aqueous solution of the polypeptide is lyophilized followed by milling into an appropriate particle size of 0.5 to 10 μ m in median diameter to target either an upper or lower respiratory tract. The polypeptide aerosol suspension prepared in a pressurized metered-dose inhaler and administered by oral inhalation was found to produce desired local and systemic effects in animal tests. The biological response obtained with the polypeptide aerosol compares favorably to the response obtained from parenteral administration.

Data supplied from the esp@cenet database - I2